

## ニワトリの性染色体DNAプローブを利用した鳥類性染色体の分子進化に関する解析

著者	小川 晃
号	560
発行年	1997
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/16720">http://hdl.handle.net/10097/16720</a>

氏 名(本籍)	小 <sup>お</sup> 川 <sup>がわ</sup> 晃 <sup>あきら</sup>
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 5 6 0 号
学位授与年月日	平 成 10 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科農芸化学専攻 (博士課程)
学 位 論 文 題 目	ニワトリの性染色体DNAプローブを利用した鳥類性 染色体の分子進化に関する解析
論文審査委員	(主 査) 教 授 水 野 重 樹 教 授 南 澤 究 教 授 山 谷 知 行

# 論文内容要旨

## 第1章 序論

脊椎動物の性染色体の構成は雄特有のY染色体と雌雄共通のX染色体とからなるXY型もしくは雌特有のW染色体と雌雄共通のZ染色体とからなるZW型とに大別されるが、染色体の形態的分化が不明瞭であるために性染色体が未同定の種も多い。魚類は約23,000種を有し、脊椎動物全体の半分以上の種を有する脊椎動物中最大の上綱 (superclass) であるが、性染色体が同定されているものは極めて少ない。同定されている魚類の性染色体にはXY型及びZW型の両方が存在する。また、両生類 (約2,000種)、爬虫類 (約5,000種) においても性染色体が形態的に同定できない種、ZW型あるいはXY型の性染色体を持つ種が報告されている。XY型である哺乳類では、単孔類に分類されるカモノハシのX染色体とY染色体がほとんど同じ形態を示し、ZW型の鳥類では、平胸類に分類されるエミュなどでZ染色体とW染色体が形態的に区別できないという特徴が知られている。しかし、哺乳類全体 (約4,500種) に占めるカモノハシの割合、または平胸類鳥類種 (10種) が鳥類全体 (約8,650種) に占める割合を考慮すれば、それぞれの綱 (class) の中では例外的な存在で、魚類、両生類、爬虫類における性染色体の構成と形態的な特徴に比べ、哺乳類のXY型と鳥類のZW型の性染色体構成並びに形態は、それぞれの綱を代表するものであるといえる。

哺乳類では、ヒトゲノム計画によりX及びY染色体上の遺伝子やDNA配列が明らかにされつつあり、その中にはX、Y両染色体間で相同性を示すDNA配列の存在が知られている。これらのDNA配列の中には、単孔類と有袋類の祖先種が真獣類の祖先種から分岐した後、真獣類の祖先種において常染色体から転座などにより移動したと考えられるもの (ZFX, ZFY) も含まれる (Watson et al. 1991, Graves and Watson 1991) が、X-Y間で相同性を示すDNA配列の存在は、一般にX染色体とY染色体とが常染色体のような相同染色体から進化したことを示唆するものと考えられている。一方鳥類では、ニワトリのW染色体を構成するDNAとしてXhoIファミリーとEcoRIファミリー反復配列がクローニングされていたが、その鳥類種間における保存性はGallus属特異的であり、種の分化と性染色体の変動という観点からは興味深いが、鳥類W染色体の進化を広く解析するために利用できるものではなかった。しかし、その後ニワトリのZ染色体上の遺伝子としてZOV3 geneとiron-responsive element binding protein (IREBP) geneの2種がクローニングされ、他の鳥類種のZ染色体上にも保存されていると推定された (斎藤靖史 1992年 博士論文)。Ohno (1967) により性染色体が常染色体の様な相同染色体から進化したという仮説が発表されたが、鳥類のZW染色体の分子進化については、性染色体を構成するDNA配列のクローニングの報告が上記以外では殆どなかったこともあり、今まで明らかにされていなかった。

精原細胞 (XY, ZZ) は精巣で、卵原細胞 (XX, ZW) は卵巣で有糸分裂によりそ

の数を増すが、精巣ではある一定数以上の配偶子（精子）形成を個体の一生を通じて長期間維持するために、卵原細胞の有糸分裂回数と比べ精原細胞はより多くの有糸分裂を繰り返す。生殖細胞のDNA複製により生じる変異発生率の上昇は分子進化速度に大きく影響し、雌よりもむしろ雄個体が分子進化を進めていると考えられている（Miyata et al. 1987）。Y染色体は雄のみが有する染色体であり、X染色体は雌雄両性が有することから、X染色体DNA配列よりもY染色体DNA配列の分子進化速度は速いと思込まれる（Miyata et al. 1987）が、実際にY染色体上のDNA配列の分子進化速度はX染色体上のDNA配列の分子進化速度に比べて速い例が知られている。配偶子形成に着目したMiyata (1987)の考えが正しいとすれば、卵形成過程で複製されるW染色体はZ染色体よりもそのDNA配列の分子進化速度が遅く、比較的古いDNA配列を染色体上に保持している可能性が考えられる。ニワトリのW染色体上でXhoIファミリーとEcoRIファミリー反復配列が存在している領域はヘテロクロマチン化しているが、両反復配列が存在していない領域はユウクロマチンを含み、減数分裂時にZ染色体との対合に寄与する。ヒトのY染色体に認められる、キナクリン染色で濃染されるヘテロクロマチン領域とX染色体との対合に寄与するユウクロマチン領域の特徴はニワトリのW染色体のそれと類似している。ヒトY染色体上のユウクロマチン領域には未分化な性腺を精巣へ分化誘導する性決定遺伝子（SRY）や精子形成に関与する遺伝子などが存在するため、ニワトリのW染色体上のXhoIファミリーとEcoRIファミリー反復配列が存在していない領域に鳥類の性決定、性分化に関わる遺伝子や、鳥類種間で保存性を示すDNA配列が存在していると推定される。しかしながら、鳥類のW染色体においてはそうした遺伝子の存在は現在まで不明で、性決定、性分化における鳥類W染色体の遺伝子機能は分かっていない。

本研究では、ニワトリの性染色体DNAプローブを用いて鳥類性染色体の分子進化について解析することを目的とした。そこで、先ずGallus属のW染色体特異的なXhoIファミリーとEcoRIファミリー反復配列が示す反復頻度の変動に着目し、W染色体の形態が現在どのように変化、変動しているのかを解析した。次に、ニワトリのW染色体DNAから鳥類種間で保存性を示す非反復DNA配列を取得し、既にニワトリのZ染色体からクローニングされていた2種の遺伝子ZOV3、IREBPも用いて、鳥類性染色体の進化上の保存性と起源について解析し、深胸類、平胸類のZ,W染色体が共通の相同染色体対から進化してきたことを示した。

## 第2章 Gallus属に特有なW染色体反復配列：種内における量的変動と染色小粒（クロモメア）の形状変化

ニワトリのW染色体特異的なDNA配列としてXhoIファミリー及びEcoRIファミリー反復配列がクローニングされていた（刀禰正英 1985年 博士論文、齊藤寿仁 1990年 博士

論文, 斎藤靖史 博士論文)。その鳥類種間における保存性はGallus属 (家鶏, 野鶏) のW染色体に特有で, Gallus属の直接の祖先種においてW染色体上に獲得された配列であることが推定される。また, ニワトリの中にはEcoRIファミリーについては高頻度に反復した個体と低頻度に反復した2つのタイプの個体が存在すること (斎藤寿仁博士論文), XhoIファミリーのゲノム中における反復頻度は品種間によって異なること (斎藤寿仁博士論文, 刀禰正英博士論文) が明らかとなっていた。このような属 (genus) 特異的あるいは属内に認められる両反復配列の変動に着目し, ランプブラシ染色体のクロモメア (chromomere) パターンとの対応をIrina Solovei博士 (Institute of Anthropology and Human Genetics, LMU) との共同研究として解析した。

### (1) ニワトリWランプブラシ染色体 (LBC) 上のクロモメアの観察

雌減数分裂前期のランプブラシ染色体標本をニワトリ (ロードアイランドレッド) の卵母細胞の核より調製し, DAPI (4',6 diamidino-2-phenylindole) 染色後に蛍光顕微鏡観察した。その結果, ZW二価染色体のW染色体部分は大小7つのクロモメアに分けることができた。

### (2) クロモメア1の有無とEcoRIファミリーの量的変動との対応

DAPI染色後のランプブラシW染色体部分を観察すると1番クロモメアを持つ個体と持たない個体とが存在することが認められた (Fig. 1A)。それらの個体から抽出したゲノムDNAを用い, EcoRIファミリープローブでサザンブロット解析すると1番クロモメアを持つ個体では高レベルに, 1番クロモメアを持たない個体では低レベルにEcoRIファミリー配列の1.2kbユニットが反復していることが認められた (Fig. 1B)。Fig. 1Bのサザンブロット解析の結果は以前の別個体についての結果 (斎藤寿仁博士論文) と一致しており, EcoRIファミリー配列の反復頻度が高レベルタイプ (約4,000回/2倍体ゲノム) または低レベルタイプ (約700回/2倍体ゲノム) であることが1番クロモメアの有無をもたらすことが示唆された。そこで, 蛍光in situハイブリダイゼーション (FISH) を行い, 1番クロモメアにEcoRIファミリー反復配列の大部分が局在することが示された (Fig. 1C)。

### (3) クロモメア3の大きさの変動とXhoIファミリーの量的変動との対応

XhoIファミリー配列の反復回数は白色レグホンで2倍体ゲノム当たり約30,000回, ファヨウミでは2倍体ゲノム当たり約5,000回と報告されている (斎藤寿仁博士論文, 刀禰正英博士論文)。今回, 4個体のファヨウミのゲノムDNAを抽出後, サザンブロット

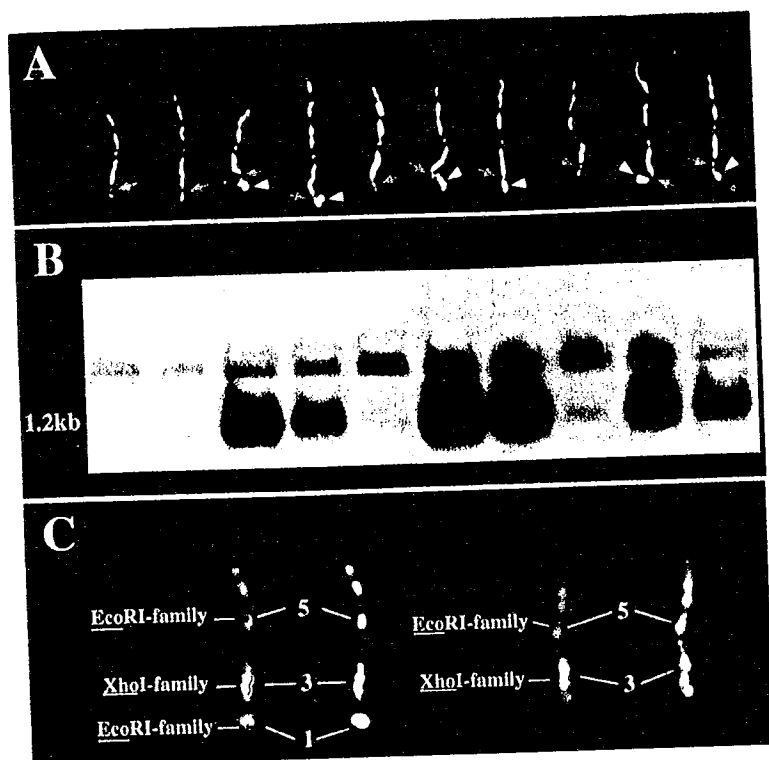


Fig. 1. The presence or absence of chromomere 1 on W-lampbrush chromosome (LBC) caused by different repetition frequencies of 1.2-kb of *EcoRI*-family.

(A) W-LBC from ten female Rhode Island Red chicken individuals (numbered in red figures) after DAPI-staining. Chromosomes from chickens 1, 2, 5 and 8 do not have the brightly stained terminal chromomere 1, which is marked with yellow arrowhead in other six chickens. Position of the small chromomere 2 is shown with a green arrow. (B) Southern blot hybridization of *EcoRI*-digested genomic DNA of chickens with *EcoRI*-family probe. The DNA was extracted from blood of the same individuals as numbered in A. The chickens possess either high (3, 4, 6, 7, 9, 10) or low (1, 2, 5, 8) copy numbers of the repeat. (C) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with *EcoRI*- and *XhoI*-family probes on W-LBCs with 7 (left pair) and 6 (right pair) chromomeres from White Leghorn (WL) or Rhode Island Red (RI) chicken. *EcoRI*-family probe (red colour) hybridized to two sites on W-LBC, the major one on chromomere 1 and the minor one on proximal end of chromomere 5. *XhoI*-family probe (white colour) hybridized along chromomere 3. Black and white images show chromomere patterns after DAPI-staining. The labeled chromomeres are numbered.

解析を行い、*XhoI*ファミリー配列の量を比較したところ、既に報告されていた通り白色レグホンよりも著しく反復回数が少ないことが確認された (Fig. 2A)。そこで、サザンブロット解析で*XhoI*ファミリー配列の量を調べた同一個体の卵母細胞からランプブラシ染色体標本を作成し、DAPI染色後のW染色体を観察した (Fig. 2B)。特徴として、ファヨウミの3番クロモメアの大きさが白色レグホンのそれよりも著しく小さいこと (Fig. 1Cと比較)、ファヨウミの1番クロモメアに新たにサブクロモメア1aが存在すること (Fig. 1Cと比較) が認められた。ファヨウミのランプブラシ染色体標本に対して*EcoRI*ファミリープローブ及び*XhoI*ファミリープローブを用いてFISHを行ったところ、ファヨウミの小さな3番クロモメアに*XhoI*ファミリー配列が局在していることが示され (Fig. 2C)、*XhoI*ファミリーの反復頻度が変動すると3番クロモメアの大きさもそれに応じて変動していることが明らかになった。また、*EcoRI*ファミリー配列がファヨウミの1番クロモメア上には存在しているが、サブクロモメア1a上には検出されなかったことから、新たな反復配列の存在が推定された。以上の結果から、特定の反復配列が性染色体上の特定のクロモメアの形成や大きさの変動に直接関与することが示された。

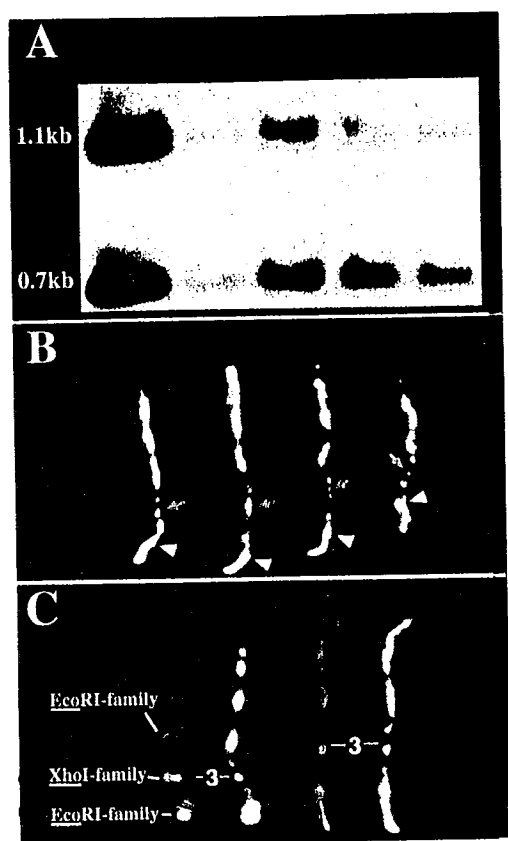


Fig. 2. Different repetition frequencies of XhoI-family causes a remarkable change in the size of chromomere 3 on W-LBC. (A) Southern blot hybridization of XhoI-digested genomic DNA of White Leghorn (WL, 11) and Fayoumi (Fc, 12-15) chickens with XhoI-family probe. 0.5  $\mu$ g DNA of White Leghorn (11) or 2  $\mu$ g DNA of Fayoumi (12-15) was applied to 1.5 % agarose gel electrophoresis. (B) Chromomere patterns of W-LBC from four Fayoumi individuals (12 - 15) after DAPI-staining. A remarkably small chromomere 3 (green arrow) and a bright subchromomere 1a (yellow arrowheads) are indicated. (C) FISH with EcoRI- and XhoI-family probes on Fayoumi W-LBCs isolated from chicken 14 and 15. XhoI-family probe (green colour) hybridized to a small chromomere 3. EcoRI-family probe (red colour) hybridized to chromomere 1 and the proximal end of chromomere 5, but not to subchromomere 1a. Black and white images show chromomere pattern after DAPI-staining.

### 第3章 鳥類種間で保存性を示すニワトリW染色体上の非反復DNA配列部位の解析

ニワトリのW染色体から得られたXhoIファミリー及びEcoRIファミリー反復配列は属特異的であったので、鳥類のW染色体の分子進化を広く調べることに利用できなかった。そこで、鳥類種間のW染色体上に広く保存性を示す非反復DNA配列を取得し、その諸性質を解析することにした。

#### (1)ニワトリW染色体上の非反復DNA配列部位のクローニング

東海大学医学部の池田穰衛教授との共同研究として、斎藤靖史博士により1本のニワトリW染色体DNAから $\lambda$ ファージベクターを用いてW染色体ゲノムライブラリーが構築されていた。このライブラリーからランダムに296クローンを拾い、それぞれをプローブとしてニワトリ雄雌ゲノムDNAに対するスロットブロットおよびサザンブロットハイブリダイゼーションを行なった。その結果、CW-01とCW-50の2クローンをW染色体特異的非反復配列として取得した。雌ニワトリゲノムライブラリーからCW-01を含む約25kbの領域（CW-01領域）とCW-50を含む約27kbの領域（CW-50領域）をカバーする

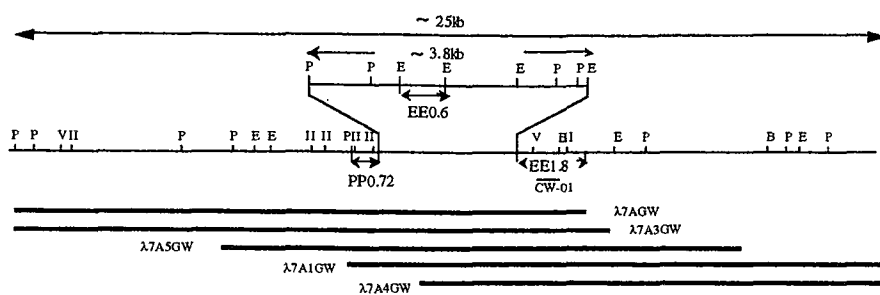


Fig. 3. A 25-kb non-repetitive sequence region (CW-01 region) cloned from the W chromosome of chicken.

Recognition sites of several restriction enzymes, positions of five genomic clones obtained from the λGEM12 genomic library of a female chicken, positions of the CW-01 sequence, EE0.6 and other restriction fragments are indicated. The about 3.8-kb region is widely conserved among Carinatae birds. Restriction enzymes are abbreviated as follows: P, *Pst*I; V, *Eco*RV; II, *Bgl*II; E, *Eco*RI; B, *Bam*HI.

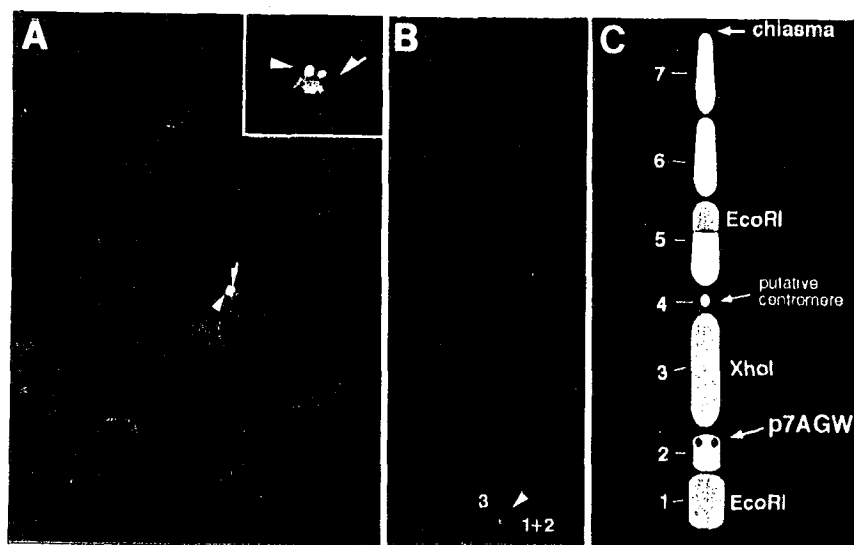


Fig.4. Localization of the p7AGW sequence on the W chromosome of chicken by FISH.

(A) A mitotic metaphase set from a female chicken embryonic fibroblast was hybridized with digoxigenin (DIG)-labeled pUGD1201 (*Eco*RI-family), DIG-labeled pUGD0600 (*Xho*I-family) and biotinylated p7AGW. Hybridization of the DIG-labeled probes was detected with trimethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC) fluorescence (pink, arrow), and that of the biotinylated probe was detected with fluorescein isothiocyanate (FITC) fluorescence (white, arrowhead). Chromosomes were counterstained with DAPI. The inset shows an enlarged W chromosome. Bar = 10μm. (B) A lampbrush ZW bivalent from an oocyte of chicken was hybridized with biotinylated p7AGW and hybridization was detected with FITC fluorescence (yellow, arrowhead). The bivalent was counterstained with propidium iodide (PI). (C) A schematic illustration of the chicken lampbrush W chromosome, indicating chromomeres (numbered) and distribution of *Xho*I-family, *Eco*RI-family and p7AGW sequences. Chromomeres are numbered according to Solovei *et al* (1993).

クローン群を取得した (Fig. 3)。また、ゲノムクローンのインサートをプラスミドベクターに組み換えることにより得られたp7AGW (CW-01領域) 及びpGW50S5 (CW-50領域) をプローブとして、体細胞分裂の染色体標本とランプブラシ染色体標本に対するFISHを行い、両領域共にW染色体由来であることを確認し、ランプブラシ染色体上の2番クロモメア上の3番クロモメア側 (p7AGW ; CW-01領域) (Fig. 4) と5番クロモメア上の4番クロモメア側 (pGW50S5 ; CW-50領域) にマッピングした。



## (2)鳥類種間で保存性を示す非反復DNA配列部位の検索と塩基配列の解析

Fig. 3に示すCW-01領域中のDNA断片PP0.72とEE1.8をプローブに用いてサザンブロット解析を行った場合には、キジ目 (Galliformes) 以外の鳥類種のW染色体上に保存性は認められなかった。しかし、Fig. 3で示される約3.8kbのPstI-EcoRI内の制限酵素消化断片をプローブに用いてサザンブロット解析を行うと、分類学上の目 (order) を越えて鳥類種のW染色体上に広く保存性が認められた。また、CW-50領域中にはCpGアイランドと考えられる部位が認められ、約2.5kbの塩基配列を決定したところ実際にCpG配列に富んでいたが、近傍の配列については広範囲の鳥類種間におけるW染色体上の保存性は認められなかった。

以上のような特徴を持つ2つの領域についてエキソントラッピング法 (Buckler *et al.* 1991) により遺伝子検索を行った (Table1)。CW-01領域からは鳥類種間のW染色体上に保存性を示す推定エキソン配列、ET-15及びET-02が得られた (Fig. 5, 6)。ET-15及びET-02の塩基配列は先の約3.8kbの領域由来であった。ET-15では全ての読み枠にストップコドンが存在したが、ET-02ではオープンリーディングフレームが認められた。

Table 1. Characteristics of individual putative exons amplified by the exon trapping procedure for CW-01 and CW-50 regions.

Putative exon	Sizes (bp) <sup>†</sup>	Phage clone <sup>‡</sup>	Conservation on § sex chromosomes	ORF <sup>¶</sup>	homology
ET-02	334	λ7AGW	Yes	Yes	-
ET-05††	233	λ7AGW	Not tested	Yes	-
ET-07	334	λ7A4GW	Not tested	Yes	identical to ET-02
ET-15	107	λ7A4GW	Yes	No	-
ET-18	311	λ7A4GW	Not tested	Yes	-
ET-F	87	λ7A4GW	Not tested	Yes	-
ET-01	261	λGW50S5	No	No	-
ET-K	270	λGW50S4	Not tested	Yes	CR1 repeat
ET-L	103	λGW50S4	Not tested	Yes	-

<sup>†</sup> Sizes were determined by sequencing.

<sup>‡</sup> Phage clones from which putative exons were amplified are indicated.

§ Suggested by Southern blot analysis.

¶ Open reading frame.

†† ET-02 and ET-07 sequences include the ET-05.

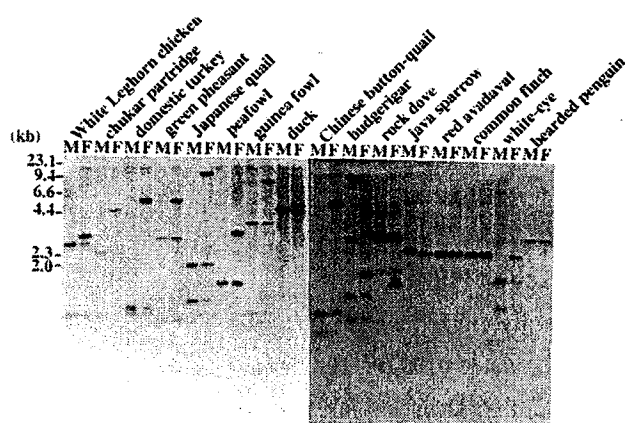


Fig. 5. Southern blot hybridization with <sup>32</sup>P-labeled ET-15 to HindIII-digested genomic DNAs (10µg / lane) from male (M) and female (F) pairs of 16 different avian species belonging to 7 different orders. DNA size markers are λDNA digested with HindIII.

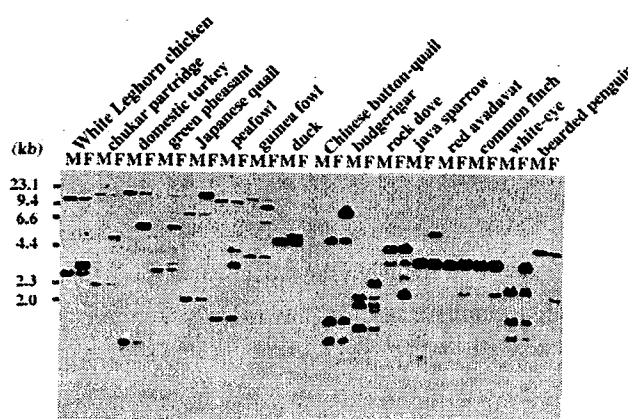


Fig. 6. Southern blot hybridization with <sup>32</sup>P-labeled ET-02 to HindIII-digested genomic DNAs (10µg / lane) from male (M) and female (F) pairs of 16 different avian species belonging to 7 different orders. DNA size markers are as in Fig. 5.

#### 第4章 深胸類鳥類種の性判別ユニバーサルプローブとしてのEE0.6配列

第3章で示された鳥類種のW染色体間で保存性を示す約3.8kbの領域について更に多くの深胸類の種について、比較解析を行った。

##### (1) 深胸類鳥類種のW染色体上におけるEE0.6配列の保存性

ニワトリW染色体由来の3.8-kbのPstI-EcoRI領域中に存在する約600bpのEcoRI断片（EE0.6）をプローブに用いてサザンブロット解析を行うと雌特異的なDNA断片が検出され、EE0.6配列が分類学上の目を越えて8目18種の深胸類（平胸類以外の通常のトリ）のW染色体上に保存されていることが示された（Fig. 7）。しかし、キングペンギン、コウノトリでは雌特異的な断片の他に雌雄で同じ鎖長のDNA断片が検出された。そのシグナル強度を比較すると雄の方が雌に比べ強く、Z染色体由来のDNA断片であることが示唆された。故に、EE0.6配列の関連配列がZ染色体上にも存在し、Z、W染色体上の配列の相同性が種によっては大きいことが推定された。

塩基配列レベルで、EE0.6配列の保存性を調べるため、雌アヒル及び雌ハトのゲノムライブラリーからEE0.6ホモログをクローニングし、塩基配列を決定

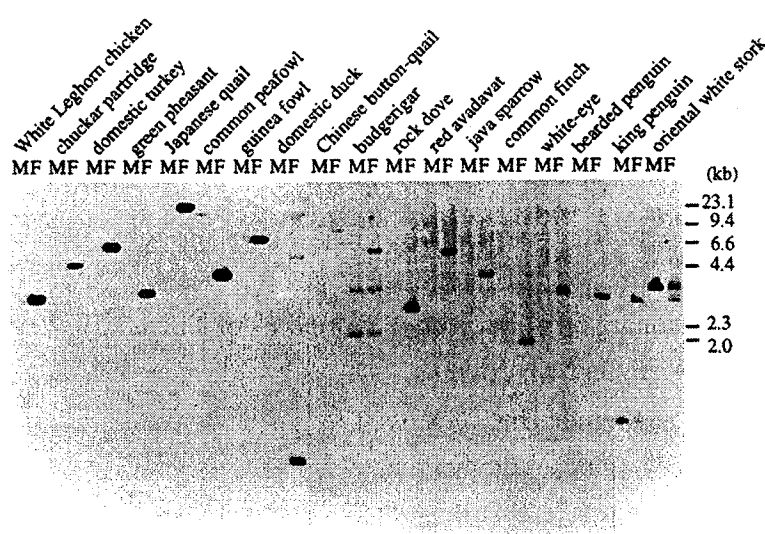


Fig.7. Detection of female-specific DNA fragments by Southern blot hybridization with  $^{32}\text{P}$ -labeled EE0.6 probe. *Hind*III-digested genomic DNA samples (10 $\mu\text{g}$  / lane) were from female (F) and male (M) species, as indicated, belonging to 8 different orders: Galliformes (White Leghorn chicken, chukar partridge, domestic turkey, green pheasant, Japanese quail, common peafowl, guinea fowl); Anseriformes (domestic duck); Gruiformes (Chinese button-quail); Psittaciformes (budgerigar); Columbiformes (rock dove); Passeriformes (red avadavat, java sparrow, common finch, white-eye); Sphenisciformes (bearded penguin, king penguin) and Ciconiiformes (Oriental white stork). DNA size markers are as in Fig.5.



EE0.6によって検出される雌特異的なDNA断片の他に雌雄間のシグナル強度が1:2のDNA断片が検出された (Fig. 5)。このことから、ET-15配列は多くの深胸類鳥類種のW染色体及びZ染色体上に存在することが示唆された。ET-15配列とEE0.6配列とがサザンブロットで同じ結果を示さないのは、EE0.6中のET-15以外の部位の配列がW染色体上の配列としての特異性を強く持つためであると推定された。こうした考察の結果、PCRの際にW染色体上の配列のみが増幅されるよう、ET-15配列以外の比較的保存性の高い部分にプライマー、USP1及びUSP3を設定した (Fig. 8)。

USP1及びUSP3プライマーを用いて、ニワトリと同じキジ目に属する種 (species) および塩基配列の保存性が示されたアヒル、ハトで雌特異的なPCR増幅が認められた。更に、塩基配列を決定していないオウム目のセキセイインコ、スズメ目のベニスズメ、ブンチョウ、ジュウシマツでも雌特異的なPCR産物が認められたことから、他の多くの鳥類種においてもこのプライマーセットが性判別に利用できることが分かった (Fig. 9)。しかし、キングペンギンのように雌雄両方から同じDNA鎖長の位置にPCR産物が得られる場合もあることから、USP1及びUSP3プライマーで性判別できない鳥類種のためには新たなプライマーを設定する必要があると認められた。

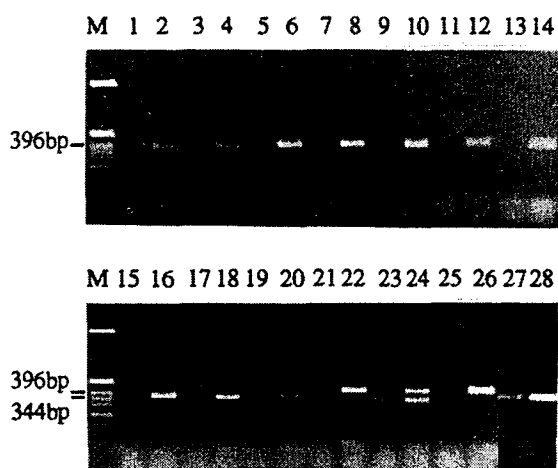


Fig.9. Amplification of EE0.6-related sequences by polymerase chain reaction (PCR) from the genomic DNAs of species belonging to different orders of Carinatae birds.

Genomic DNA samples from males (odd-numbered lanes) and females (even numbered lanes); White Leghorn chicken (lanes 1 and 2), chukar partridge (lanes 3 and 4), green pheasant (lanes 5 and 6), Japanese quail (lanes 9 and 10), common peafowl (lanes 11 and 12), guinea fowl (lanes 13 and 14), domestic duck (lanes 15 and 16), budgerigar (lanes 17 and 18), rock dove (lanes 19 and 20), red avadavat (lanes 21 and 22), java sparrow (lanes 23 and 24), common finch (lanes 25 and 26) and king penguin (lanes 27 and 28), were subjected to PCR using a set of primers, USP1 and USP3 indicated in Fig. 8., agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. DNA size markers(M) are HinfI-digested pBR322 DNA. Only the sizes of markers close to the amplified band are indicated on the left.

## 第5章 3種のニワトリ性染色体DNA配列の平胸類ホモログのクローニングと塩基配列の解析

平胸類の性染色体対の同定と深胸類性染色体との進化的起源の比較を行う目的で、先ず、ニワトリのZ染色体上の2種の遺伝子ZOV3、IREBPの深胸類のZ染色体上における保存性を調べた。次に、平胸類ゲノムにおける保存性を調べるために、EE0.6、ZOV3、IREBP配列のホモログをエミュ及びダチョウからクローニングし、塩基配列を解析した。

(1)ニワトリZ染色体上に存在する2種の遺伝子 (IREBP、ZOV3) の深胸類鳥類種Z染色体上における保存性

ニワトリIREBPcDNA断片をプローブとしてサザンブロット解析を行うと5目6種の深胸類鳥類種において雄：雌＝2：1の強度のシグナルが得られた (Fig. 10)。また、ニワトリZOV3cDNA断片をプローブとしてサザンブロット解析を行うと6目10種の深胸類鳥類種において雄：雌＝2：1の強度のシグナルが得られた (Fig. 11)。これらの結果から、

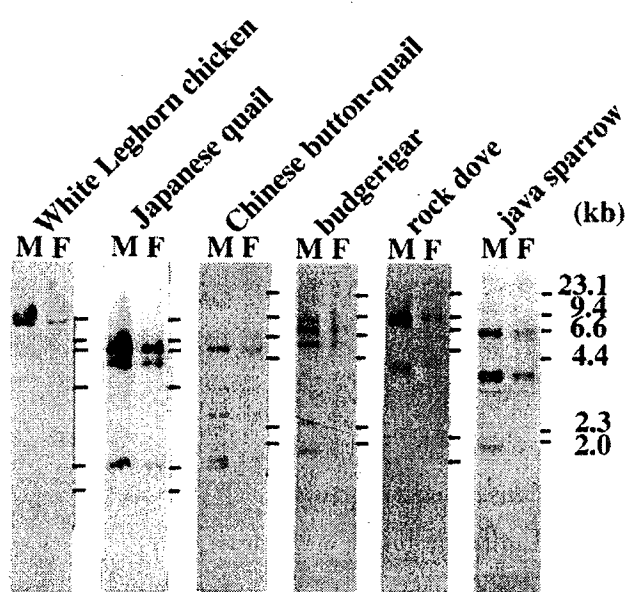


Fig.10. Suggestion of Z chromosome-linkage of IREBP gene in six avian species representing five different orders by Southern blot hybridization. EcoRI-digested male (M) or female (F) genomic DNAs (10 $\mu$ g / lane) were hybridized with the  $^{32}$ P-labeled chicken IREBP cDNA probe.

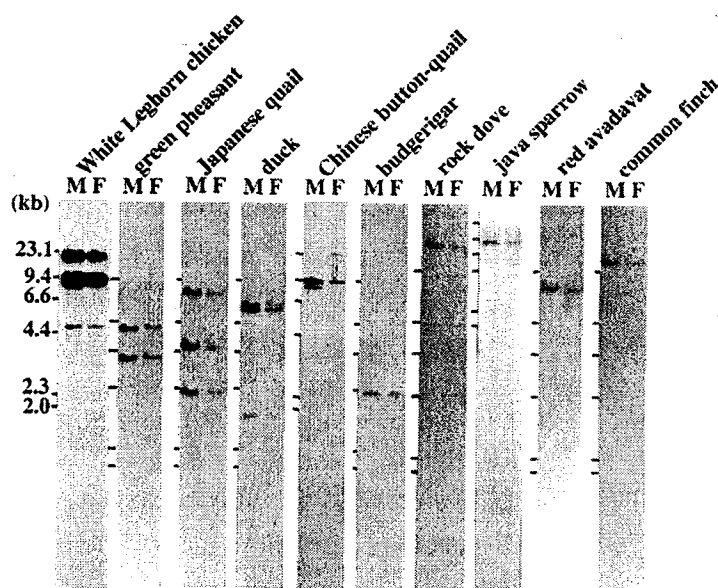


Fig. 11. Suggestion of Z chromosome-linkage of ZOV3 gene in ten avian species representing six different orders by Southern blot hybridization. EcoRI-digested male (M) or female (F) genomic DNAs (5 $\mu$ g / lane except for Java sparrow: 10 $\mu$ g / lane) were hybridized with the  $^{32}$ P-labeled chicken ZOV3 cDNA probe.

調べた全ての鳥類種のZ染色体上にIREBP及びZOV3が保存されていることが示された。深胸類鳥類種間において、ゲノムDNAの約10%を占めるZ染色体は4番目または5番目に大きな染色体で、その大きさ（染色体長）もほぼ類似しているという特徴があり、albinismという同じ表現型を示す伴性遺伝が鳥類に広く認められることからOhno (1967) は鳥類の祖先種が持っていたZ染色体は鳥類種間において保存されているという説を発表した。IREBP, ZOV3の2種の遺伝子が深胸類鳥類種のZ染色体上に保存されているという本研究で得られた結果はOhno (1967) の説を支持する結果である。

## (2)EE0.6, IREBP, ZOV3配列の平胸類ホモログのクローニングと塩基配列解析

平胸類に分類されるエミュの雌からゲノムライブラリーを構築し、ニワトリのEE0.6, IREBP, ZOV3配列のホモログを含むゲノムクローンpEGEE0.6, pEGIREBP, pEGZOV3を取得した。また、雌のダチョウから構築したゲノムライブラリーより同様に、EE0.6, IREBP, ZOV3配列のホモログを含むゲノムクローンpOGEE0.6, pOGIREBP, pOGZOV3を取得した。それぞれのゲノムクローンを制限酵素で消化した際に得られるDNA断片の内、ニワトリのEE0.6断片, IREBPcDNA断片, ZOV3cDNA断片とハイブリダイズするものについて部分的に塩基配列を決定した。ホモロジープロットによって、エミュとダチョウのIREBPとZOV3に対するゲノムクローン, pEGIREBP, pOGIREBP, pEGZOV3, pOGZOV3中に推定エキソン配列が存在することが示された (Fig. 12, 13)。また、推定エキソンがコードするアミノ酸配列をニワトリのそれと比較したところ高い相同性が認められた (Fig. 14, 15)。これらの結果からゲノムクローンpEGIREBP, pOGIREBPはIREBP遺伝子の一部を, pEGZOV3, pOGZOV3はZOV3遺伝子を含むことが強く示唆された。更に, pEGEE0.6, pOGEE0.6中にもニワトリEE0.6配列と相同性を示す塩基配列の存在がホモロジープロットによって見いだされた。実際, EE0.6関連配列がニワトリ, ダチョウ, エミュ, アヒル, ハト, コウノトリで良く保存されていることが塩基配列の比較により示

Table 2. Percent identities of nucleotide and/or deduced amino acid sequences for EE0.6, IREBP and ZOV3 among chicken, emu and ostrich.

Species compared	EE0.6 % [bp]	IREBP % [bp]	ZOV3 % [bp]
chicken - emu	74 [511]	92 [220] (94)	81 [327] (72)
chicken - ostrich	71 [635]	90 [123] (100)	80 [325] (73)
ostrich - emu	88 [488]	NC	94 [317] (95)

Lengths of aligned nucleotide sequences compared are shown in brackets. Identity of deduced amino acid sequences is shown in parentheses. For IREBP, sequences of two exons in 2687-bp genomic sequence for emu and that of one exon in 1075-bp genomic sequence for ostrich are used for comparison. For ZOV3, sequences of two exons in 2206-bp for emu and those of two exons in 3431-bp for ostrich are used for comparison. NC: not compared because exons in cloned genomic fragments are unrelated.

れた (Fig. 16)。ニワトリ, エミュ, ダチョウのEE0.6, IREBP, ZOV3の塩基配列と推定アミノ酸配列 (IREBP, ZOV3のエキソン部分について) に関する高い相同性についてTable 2にまとめて示した。









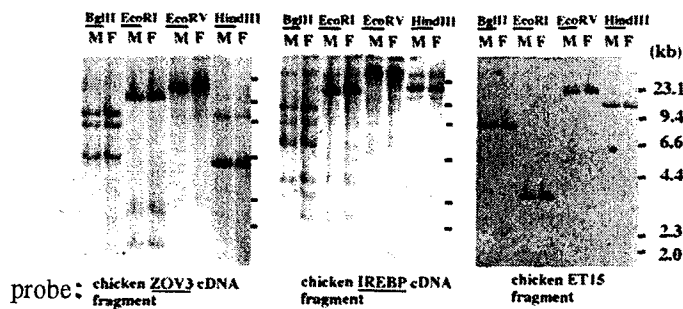


Fig.18. Southern blot hybridization of genomic DNA from a male (M) and female (F) pair of emu digested with restriction enzymes as indicated.

The blot hybridized with ZOV3 probe was rehybridized successively with IREBP and ET-15 (within EE0.6) probes. Intensities of signals in male are about the same as those in female, suggesting that copy numbers of ZOV3, IREBP, or ET-15 is the same between both male and female in emu.

IREBPcDNA断片,  
ZOV3cDNA断片, ET-15断片  
をそれぞれプローブとした,  
エミユの雄雌ゲノムDNAに  
対するサザンプロット解析で  
は, 雌雄間に共通なほぼ同程  
度の強度のシグナルが検出さ  
れた以外に性特異的なDNA  
断片の存在が認められなかった  
(Fig.18) ことから, もし, 雄  
エミユの染色体標本に対する  
FISHを行えば, 雌エミユと同  
じ結果になると考えられた。

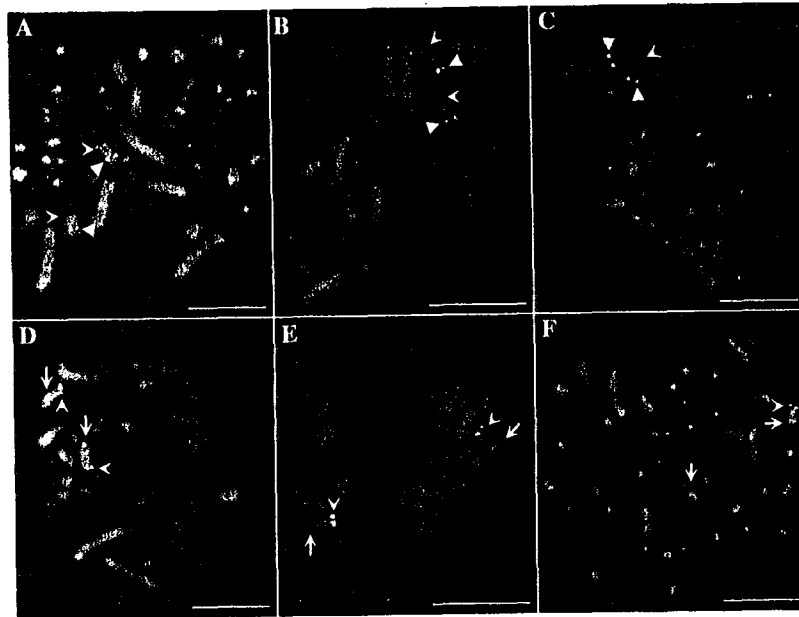


Fig. 17. Localization of IREBP, ZOV3 and EE0.6 sequences on a pair of chromosomes in metaphase sets of emu and ostrich.

Signals of FISH shown by FITC (white dots) or TRITC (red dots) fluorescence are with: (A) DIG-pEGIREBP (arrowhead) and biotinylated pEGZOV3 (triangle) on a female emu set, (D) biotinylated pEGIREBP (arrowhead) and DIG-pEGEE0.6 (arrow) on a female emu set, (B) DIG-pOGIREBP (arrowhead) and biotinylated pOGZOV3 (triangle) on a male ostrich set, (E) biotinylated pOGIREBP (arrowhead) and DIG-pOGEE0.6 (arrow) on a male ostrich set, (C) as in (B) but on a female ostrich set, and (F) as in (E) but on a female ostrich set. Bars indicate 10μm.

FISH後の染色体を大きさの順に並べると IREBP, ZOV3, EE0.6配列が共にマップされた染色体は、エミュでは5番染色体、ダチョウでは4番染色体であることが明らかとなった(Fig. 19)。第5章でも述べた様に、深胸類鳥類種におけるZ染色体は4番目または5番目に大きな染色体であるという特徴などに基づき、鳥類のZ染色体は保存されているという説がOhno (1967)により報告されている。このことから本研究において深胸類鳥類種の性染色体に特有なDNA配列が局在することが示されたエミュの5番染色体、ダチョウの4番染色体は平胸類の性染色体である可能性が考えられた。



Fig.19. Identification of the pair of homologous chromosomes on which ZOV3, IREBP and EE0.6 sequences are colocalized.

Chromosome pairs 1 to 6, from the in situ hybridized metaphase sets of the female emu (A) and the male ostrich (B), are shown. FISH signals are colocalized on the chromosome 5 in emu (A), and the chromosome 4 in ostrich (B). Fluorescence signals are as shown in Fig.17.

## (2)ダチョウにおけるW染色体の形態分化

雄、雌及び性別不明個体（#7,#8）のダチョウの4番染色体をFISH後に並べて比較すると、雌とダチョウ#8の4番染色体対では IREBPのシグナルが片方の染色体上から消失していること、 IREBPのシグナルが消失しているアームがわずかに短くなっていることが認められた (Fig.20)。ダチョウの性染色体は今まで同定されていないが、今回のFISH法を組み合わせた染色体の観察結果から IREBPが存在する雌雄共通の少し大きな染色体がZ染色体で、雌でのみ IREBPが消失しているやや小さい染色体がW染色体であることが示された。

雄及び雌のゲノムにおける IREBP遺伝子のコピー数を比較するため、 BglII消化したゲノムDNAを用いてサザンブロット解析を行った (Fig. 21)。初めに、ダチョウのEE0.6関連配

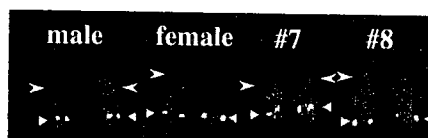


Fig.20. Partial differentiation of the ostrich W chromosome as demonstrated by its lacking the IREBP locus.

Pairs of chromosome 4 of ostrich were taken from in situ hybridized metaphase sets of the male, female and sex unknown individuals #7 and #8. Fluorescence signals shown are with biotinylated pOGZOV3 (triangle) and DIG-labeled pOGIREBP (arrowhead).

Differentiation of W chromosome in the female and #8 ostrich is indicated by shortening of the arm from which the IREBP gene is missing.

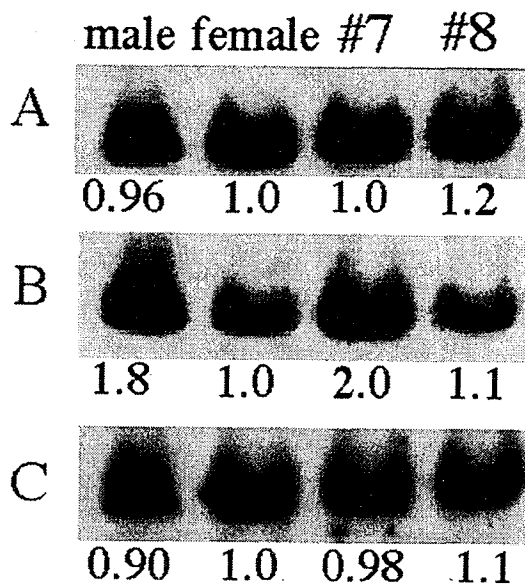


Fig.21. Suggestion of the absence of IREBP gene on one of homologous chromosomes in the female ostrich. The BglII-digested genomic DNA (5 $\mu$ g/ ml) of ostrich was subjected to Southern blot hybridization with following  $^{32}$ P-labeled probes: (A) 2.4kb XbaI fragment of pOGEE0.6, (B) 2.7kb EcoRI-BglII fragment of pOGIREBP and (C) 3.5kb BamHI fragment of pOGZOV3. The same blot was hybridized and rehybridized in this order. DNA samples were from a male, female , or sex unknown individuals (#7 and #8) . Intensities of hybridization signals were measured by BAS2000 bio-image analyser (Fuji Photo Film Co.) and their relative ratios to the intensity of the female signal are indicated.

列を含むDNA断片をプローブにすると、ほとんど同じシグナル強度を持つ単一のバンドが雄、雌、性別不明個体（#7、#8）のダチョウで検出され（Fig. 21A），EE0.6関連配列がダチョウのZとW染色体の両方に存在していることが示された。次に、同じプロットを用い、ダチョウIREBPホモログをプローブとしてハイブリダイゼーションを行うと、雄におけるシグナル強度は雌の約2倍で、性別不明個体#7のシグナルの強度は性別不明個体#8よりも約2倍強かった（Fig. 21B）。この結果はFISHの結果と一致しており、IREBP遺伝子はダチョウのW染色体上から失われているものと考えられた。また、性別不明個体#7は雄で、性別不明個体#8は雌であることが示された。最後に、同じプロットをダチョウZOV3ホモログをプローブとしてハイブリダイゼーションを行ったが、シグナルの強度は雌雄間でほぼ同じであった（Fig. 21C）。

平胸類が単系進化（monophyletic evolution）を遂げた鳥類種であることと見なされていることから、深胸類性染色体上のDNA配列がダチョウの性染色体上にも保存されていたことは、深胸類鳥類種と平胸類の性染色体の進化的起源が同じであることを示している。

## 第7章 総合考察

### (1) Gallus属におけるW染色体特異的反復配列とWランプブラシ染色体の形状変化との関係

ニワトリのW染色体においてEcoRIファミリー配列とXhoIファミリー配列の分布する領域はヘテロクロマチン形成部位とほぼ一致しているが、染色体上の特定のクロモミアに

EcoRIファミリー配列とXhoIファミリー配列がそれぞれ局在し、反復頻度によりその大きさが変化するという第2章で得られた事実に基づくと、EcoRIファミリー配列とXhoIファミリー配列がそれぞれ基本骨格となって、ヘテロクロマチンのような特定の広領域のクロマチン状態が構築されている可能性が考えられる。この可能性はこれらの反復配列と相互作用するクロマチンタンパク質の分子種と機能を明らかにすることにより証明することができると思われる。

ニワトリでは、W-ヘテロクロマチンとZ染色体の端部ヘテロクロマチンが主要なヘテロクロマチンであり、共にGallus属に特異的反復配列が構成成分となっている。属の分化と性染色体上のヘテロクロマチンの獲得が平行関係になっていることは、進化上の偶然であるのか、属や種の分化に影響する生物学的な意義があるのかは興味深い問題である。いずれにせよ、本研究結果は鳥類の性染色体のミクロな進化ともいうべき現象が現在も続いていることを示唆するものである。

## (2)鳥類性染色体の進化上の起源

鳥類は胸骨の上の竜骨 (keel) の有無により深胸類 (keel有り) と平胸類 (keel無し) に分類される。興味深いことに、この分類は性染色体対の形態的な特徴とよく合致する。つまり、ほとんどの深胸類鳥類種では雌雄に共通なZ染色体とそれよりも小型で、ヘテロクロマチン化したW染色体を持つが、平胸類では形態的に不明瞭であるために性染色体対が同定されていなかった。しかし、本研究で行った分子レベルの解析によりダチョウのZ, W染色体が同定された。エミュでは形態的な大きな分化が認められない4番染色体上にEE0.6, IREBP, ZOV3の3配列が局在したが、Ansari (1988) らは、この4番染色体対が性染色体対であると染色体バンディング技術を用いて推定している。これら2つの異なる結果から、エミュの4番染色体対が性染色体であると考えられる。

Fig. 22にSibleyとAhlquist (1990)が発表した鳥類の系統樹を示したが、ニワトリでクローニングされたW染色体上のEE0.6配列とZ染色体上のIREBP, ZOV3の2種の遺伝子は分類学上遠く離れたスズメ目でもそれぞれW, Z染色体上に局在を示すことから、全ての深胸類のW, Z染色体上にそれぞれ保存されていることが強く示唆される。本研究において平胸類のダチョウの性染色体上にEE0.6, IREBP, ZOV3の3配列が存在していることが示されたことによって平胸類の性染色体の進化上の起源が深胸類と共通であることが明らかとなった。また、ダチョウのW染色体上ではIREBPが欠失していたこと、深胸類ではZ染色体上にのみ存在するZOV3がダチョウのZ, W両染色体上に存在していたこと、更に、EE0.6, IREBP, ZOV3の3配列がダチョウとエミュで同一の染色体対に局在していたことは、鳥類の性染色体が共通の一对の相同染色体から進化したこと、および平胸類では性染色体の進化速度が何らかの理由により極めて遅いことを示している。

Ohno (1967) は、鳥類とヘビがほぼ同じゲノムサイズであり、鳥類のZ染色体とヘビのZ染色体がそれぞれゲノムの約10%を占めることから、両染色体間に相同性が認めら

れる可能性を述べている。本研究で示されたEE0.6, IREBP, ZOV3の3配列がヘビの染色体標本においてどのような局在性を示すのか、綱 (class) という分類学上の大きな壁を越えて鳥類とヘビなど爬虫類の性染色体の分子進化的関係を解き明かすことは非常に興味深い。ヘビの性染色体はZW型であるが、近縁種でも形態的に明確に分化した性染色体対を持つ種と不明瞭な種が知られているので性染色体の分子進化を調べるのに適当であると考えられる。ヘビとカメはZW型の爬虫類であるが、性染色体から見てヘビの方が鳥類に近縁であるのか、カメの方が近縁であるのか、ヘビとカメの両方の染色体標本でEE0.6, IREBP, ZOV3の3配列の局在性を調べることにより明らかになる可能性もある。

EE0.6, IREBP, ZOV3の3配列が局在する平胸類の性染色体では、深胸類のZ, W染色体に比べ、形態的な分化が殆ど認められない。

このことは、ニワトリW染色体上のEcoRIファミリー及びXhoIファミリー配列の反復回数が種の進化の中で変動していることと比較すると、平胸類の性染色体の形態的な分化の速度は非常に遅く、そして、何らかの理由で極めて原始の性染色体に近い状態にあることを示唆するものである。これらのことは、先に述べた爬虫類でEE0.6, IREBP, ZOV3の3配列の局在性を調べることによって明らかにされるかもしれない。鳥類性染色体の共通の進化上の起源を分子レベルで初めて示したことは本研究で最も注目すべきことであると思われる。また、鳥類と爬虫類の比較というような分類学上の綱を越した性染色体進化の研究の必要性を実験的根拠から示したことは意義深いと思われる。

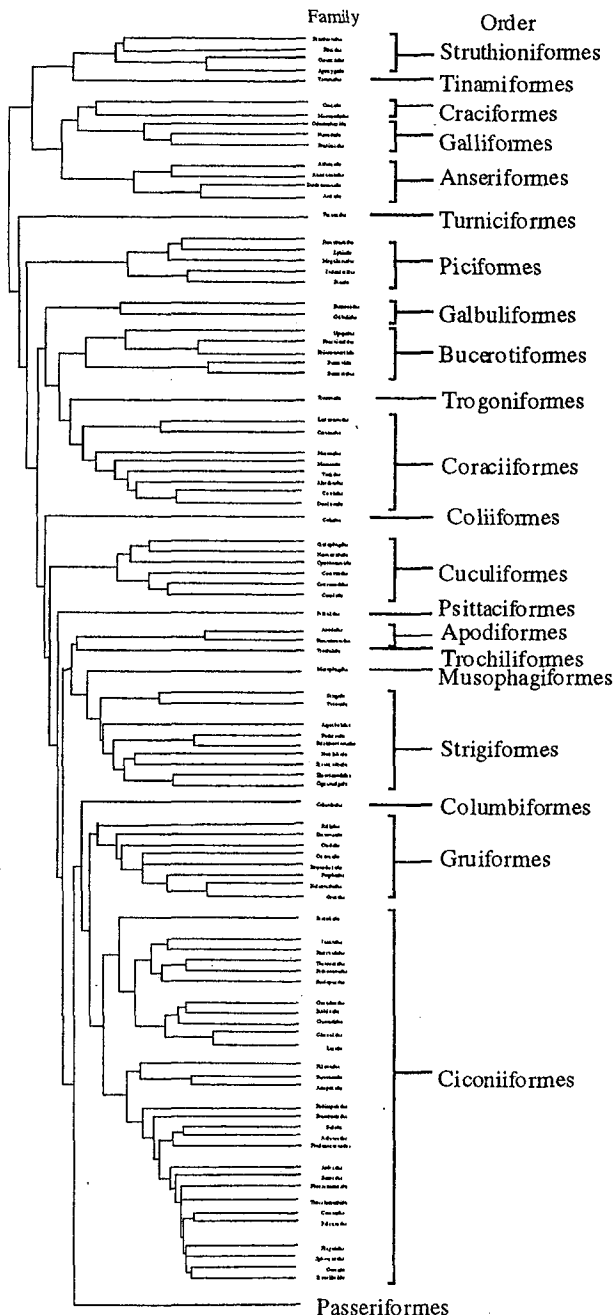


Fig. 22. Avian phylogenetic tree proposed by Sibley and Ahlquist (1990) based on the data of DNA-DNA hybridization.

In this classification, all ratite birds are included in the order Struthioniformes, button-quail is not classified into the order Gruiformes but is regarded as a single family of the order Turniciformes, and the order Ciconiiformes comprises Sphenisciformes, Gaviiformes, Podicipediformes, Charadriiformes, Falconiformes, Pelecaniformes and Ciconiiformes.

## 要約

- 1) Gallus属におけるW染色体特異的反復配列, EcoRIファミリーに認められていた反復頻度の個体差及びXhoIファミリーに認められていた品種間における反復頻度の違いがWラングブラシ染色体の特定の染色小粒(クロモメア)の有無及び形状変化と対応することが明らかにされた。
- 2) ニワトリW染色体由来の非反復配列領域(CW-01領域)を取得し, この領域に含まれる非反復DNA配列(EE0.6, ET-02)をクローニングした。EE0.6およびET-02配列は深胸類鳥類種のW染色体上に広く保存されていることが示され, 鳥類種がそれぞれ独自の進化を遂げながらも, W染色体上の配列の一部を保持しながら現在に至っていることが示された。
- 3) EE0.6が深胸類鳥類種のサザンブロットによる性判別に有効なDNAプローブであることが分かった。その塩基配列に基づいて設定されたプライマーを用いて, 部分的ではあるが鳥類種のPCRによる性判別が可能であることが示された。
- 4) ニワトリZ染色体上の遺伝子としてクローニングされていたIREBP, ZOV3が深胸類鳥類種のZ染色体上に広く保存されていることが示された。
- 5) ニワトリのEE0.6, IREBP, ZOV3のホモログを平胸類のエミュ, ダチョウからゲノミッククローンとして取得し, EE0.6配列及びZOV3, IREBPのエキソン配列が深胸類, 平胸類間で高度に保存されていることが示された。
- 6) ダチョウとエミュのEE0.6, IREBP, ZOV3ゲノミッククローンをプローブとしてFISHを行い, これらの3配列が同一の染色体対に局在すること, ダチョウの雌ではこれらの染色体対の一方がやや短く, さらにIREBP遺伝子を欠失していることが明らかにされた。以上の結果から, 深胸類及び平胸類に属する鳥類種全ての性染色体が共に共通の1対の相同染色体から進化したことが示された。

## 原著論文

Ogawa A., Solovei I., Hutchison N., Saitoh Y., Ikeda J., Macgregor H. and Mizuno S. (1997) Molecular characterization and cytological mapping of a non-repetitive DNA sequence region from the W chromosome of chicken and its use as a universal probe for sexing Carinatae birds. *Chromosome Research*, **5**: 93-101.

Ogawa A., Murata K. and Mizuno S. Sex chromosomes of ratite and carinate birds have evolved from a common homologous pair. (to be submitted to *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*).

Solovei I., Ogawa A., Naitoh M., Mizuno S. and Macgregor H. Chromomere organization of chicken lampbrush W chromosome: identification of the chromomeres containing XhoI and EcoRI repetitive families and their variation within the chicken population. (to be submitted to *Chromosome Research*).

## 参考論文

Saitoh Y., Ogawa A., Hori T., Kunita R. and Mizuno S. (1993) Identification and localization of two genes on the chicken Z chromosome: implication of evolutionary conservation of the Z chromosome among avian species. *Chromosome Research*, **1**: 239-251.

Itoh Y., Ogawa A., Murata K., Hosoda T. and Mizuno S. (1997) Identification of the sex of Oriental white stork, Ciconia boyciana, by the polymerase chain reaction based on its sex chromosome-specific DNA sequences. *Genes Genet. Syst.* **72**: 51-56.

Murata K., Itoh Y., Ogawa A. and Mizuno S. (1998) Sexing the Oriental white stork Ciconia boyciana by PCR using a single pulcked feather as a source of DNA. *Jpn. J. Ornithol.* **46**: in press.



## 論文審査結果要旨

鳥類の性染色体構成は雌ヘテロのZW型であるが、形態的に明らかなZ, W染色体をもつのは深胸類（竜骨をもち飛翔可能なトリ）に限られ、平胸類（竜骨をもたず、飛翔できない、ダチョウ、エミユなど）では形態的に明らかに性染色体を識別することはできない。本研究では鳥類がこのように分類学的に2群に分かれ、それが性染色体の形態的特徴の違いと一致することに興味をもち、これら2種の鳥類の性染色体の分子進化的な関係を中心に解析を行った。

著者はまず、ニワトリのW染色体に特異的な反復配列である*Xho* Iおよび*EcoR* Iファミリー配列のゲノム中の反復回数が個体間あるいは系統間で大きく変動する場合があることに着目し、そのような変動を示す個体の卵母細胞から減数分裂前期のランプブラッシュ染色体を分離し、ランプブラッシュW染色体上の染色小粒（クロモメア）の形態と*Xho* I, *EcoR* Iファミリー配列の分布を蛍光*in situ* ハイブリダイゼーション（FISH）により比較した。その結果、クロモメア1には*EcoR* Iファミリー配列が、クロモメア3には*Xho* Iファミリー配列が局在し、これらのファミリーの反復回数の変動に対応してそれぞれのクロモメアの大きさが変動することを示し、W染色体が現在もクロモメアレベルで変化していることを明らかにした。次に、深胸類に属するニワトリの性染色体DNAプローブを利用して平胸類の性染色体を解析することを計画した。著者はまず、所属する研究室でこれまでにクローニングされたニワトリZ染色体上の2種類の遺伝子、*ZOV3*, *IREBP*が広く深胸類鳥類のZ染色体上に保存されていることを定量的なサザンブロットハイブリダイゼーションにより示した。また、ニワトリW染色体特異的なゲノムライブラリーからW染色体上の約25 kbにわたる非反復配列部位をクローニングし、この中のEE0.6配列が広く深胸類のW染色体上に保存されていることを上記と同様の手法で示した。EE0.6配列はエキソン様配列を含むが、いずれの読み枠にも終止コドンが含まれることから偽遺伝子の一部であると考えられた。著者は、ニワトリのEE0.6, *ZOV3*, *IREBP*のホモログを雌ダチョウおよび雌エミユのゲノムライブラリーからクローニングし、塩基配列レベルで71~92%の相同性を有することを示した。次にこれらの平胸類のゲノムクローンをプローブとしてFISHを行い、これら3種の配列がダチョウの4番染色体対、エミユの5番染色体対に局在すること、雌ダチョウでは4番染色体対の一方の染色体で*IREBP*遺伝子が欠失していることを示した。この結果は、雌ダチョウのゲノムDNAに対する定量的なサザンブロットによっても確認された。以上の結果から、深胸類、平胸類の性染色体が共通の1対の相同染色体から進化したこと、平胸類ではW染色体の形態分化がごく初期段階にあることが明らかになった。

以上のように本研究により、鳥類のW染色体が現在もクロモメアレベルの変化を続けていること、深胸類、平胸類の性染色体が同一の相同染色体由来であること、平胸類の性染色体進化が停止あるいは極端に遅い速度で進行していることが初めて明らかにされたことは生物学的に重要な発見であり、今後XY型、ZW型の性染色体の分子進化的関係を解析する手がかりを与えたものと考えられることから、審査員一同、著者は博士（農学）の学位を授与されるに充分の資格を有すると判定した。